

●日本国特許庁(JP) ●特許出願公開
●公開特許公報(A) 昭61-17

①Int.Cl.[°] 分類記号 庁内整理番号 ②公開 昭和61年(1986)1月6日
A 61 K 31/725 ADU 6864-4C
/ C 06 B 37/00 7133-4C 審査請求 未請求 発明の数 1 (全1頁)

③発明の名称 Δコ多量系癌転移抑制剤

④特 願 昭59-118283

⑤出 願 昭59(1984)6月11日

⑥発 明 者 桜 井 勝 清 東大和市立野3丁目1253番地 生化学工業株式会社東京研
究所内
⑦発 明 者 堀 江 克 之 東大和市立野3丁目1253番地 生化学工業株式会社東京研
究所内
⑧発 明 者 坂 本 崇 東大和市立野3丁目1253番地 生化学工業株式会社東京研
究所内
⑨発 明 者 奥 山 隆 東大和市立野3丁目1253番地 生化学工業株式会社東京研
究所内
⑩出 願 人 生化学工業株式会社 東京都中央区日本橋本町2丁目9番地8
⑪代 理 人 弁理士 津 田 肇 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

Δコ多量系癌転移抑制剤

2. 特許請求の範囲

ヒアルロン酸若しくは硫酸ヒアルロン酸又はその塩を有効成分とすることを特徴とするΔコ多量系癌転移抑制剤。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、Δコ多量系癌転移抑制剤に関する。癌の転移には、主として外科療法・放射線療法及び化学療法が実施されているが、癌の再発及び遠隔転移の点で満足すべき治療効果を挙げていない。

この原因の一つは、これらの治療法で癌の原発巣を縮小又は除去し得ても、癌が原発巣とは別の部位、特に肺、肝又は腎臓などの主要臓器に転移増殖し、致命的な結果を招くからである。従って、癌原発巣の縮小を計るか、癌を外科的に切除する療法に加えて、癌の転移を防止することが癌の治療を計る上で極めて重要である。

癌転移の転移は、(a)発生部位における急速な癌増殖、(b)血管内への侵入、(c)特定臓器の毛細血管内への沈着、(d)血管の内側から外側への浸透、(e)転移部位での急速な増殖など多くの過程から成っている。原理的には、この中のどれか一つの過程を抑制すれば転移が抑制される筈である。(a)から(e)までの過程は、即ち、血管壁の内側への沈着とそれにつづく外側への浸透、そして増殖は、一定数の癌細胞を直接マウスの肺臓に注射し、時間を置いてそれら癌細胞の増殖と、補助となる臓器に発生する転移コロニーの数を組織学的・生化学的に定量する手続があり、多くの例が報告されている。

例えば、Sachs [A. Nat. et al.: Cancer Research, 11, 1048-1051(1951)]は、マウスメラノーマ(悪性黒色細胞癌)細胞50,000個を0.75ml/0.5マウスの肺臓に注射し、10日後に肺を切除して転移によって生じたメラノーマ細胞の黒色コロニーの数をカウントした場合、そのコロニー数の平均値はメラノーマ細胞の細胞浸透化学組成

特開可61-17(2)

と密接な関係があることを報告している。

また、上述したように細胞移動が起るために、その細胞が血管内皮に接着する過程が不可欠であるが、この接着は細胞表面の表面に存在する分子と血管内皮マトリックスを構成する分子との相互認識、結合によって引き起こされることが多くの実験結果によって明らかにされている (R. E. Kanov, et al.: Proceedings of National Academy of Sciences, U.S.A., 77: 5764-5768 (1978))。

一方、Gunnら (Y. Gunn, et al.: Can. J., 66: 888-898 (1981)) は、FMS A 細胞に細胞接着が高いほど宿主マウスの生存日数が短くなることを証明している。更に、Kikuchiら (S. Kikuchi, et al.: Cancer Research, 41, 1947-1954 (1981)) は、FMS A 細胞の細胞接着が高いほど細胞表面にヒアルロン酸 (以下「HA」という) を多量にもつことを報告している。一般的に、HA は細胞の細胞表面の HA 受容体や細胞表面及び生体内の各種組織・器官に存在するフィブロネクチンやコラーゲン

ンに細胞接着を促すことが明らかにされている。

また、HA はある程度マクロファージの貪食作用を阻害することや (R. A. Salazar: Immunology, 44, 439-449 (1980))、特に非常に強い程度では *in vitro* 及び *in vivo* でマクロファージや多核白血球 (PMN) の運動量、代謝速度、貪食作用を増加させることも知られている (L. H. Harrison, et al.: Scand. J. Immunol., 11, 649-659 (1980))。

しかしながら、HA の細胞移動抑制としての作用に関する報告は尠くはない。

また、多量糖化多糖体が細胞増殖や細胞移動抑制作用を有することが報告 (S. Yashara et al.: Can. J., 64: 888 (1978) ; K. Kikuchi et al.: Can. J., 66: 888 (1978) ; 安田重典: 日本大薬, 第47巻第 8号, 487-494 (1980)) されているが、これは多量糖化多糖体の有する抗血管新生作用や細胞移動抑制作用によるところが大きく、HA はこれらの作用は殆どもっていない。

そこで、本発明者は、動物に HA を投与すれば、

ば、これが血管内皮の HA 受容体や表面にでているフィブロネクチンに結合し、細胞が血管内皮へ接着することを防止し、また一度接着した細胞と細胞的に結合して、その細胞を内皮より剥離させると共に、HA の有する免疫増進作用で細胞を移動できるのではいかと推定し、鋭意研究を行った結果、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明のハコ多量糖化多糖体抑制剤は、HA 若しくは類似 HA 又はその断片を有効成分とするものである。

以下、本発明を更に詳細に説明する。

本発明に用いる HA は、通常、細胞、精子体など特にその由来は限定されず、通常、分子量数千から数百万のものを用いる。その調製法としては、特開第 52-148894号、同 52-108100号、同 54-87100号及び同 55-74780号公報記載の方法などが挙げられる。

本発明において、類似 HA とは、HA 又はその断片を有効成分として調製させた多量糖化多糖体抑制剤をいう。

類似 HA であって、類似度が HA のグルクロン酸と N-アセチルグルコサミンから成る繰り返し二糖 (以下「HA の繰り返し二糖」という) 1000個当たり以上であるものであり、特開第 52-148894号明細書に記載されている。

本発明において、多量糖化多糖体抑制剤とは、多量糖化多糖体を少なくとも1個含有する化合物であって、その他に、多量糖化多糖体を含有して、HA を類似するに類似した官能基を1個以上有する化合物をいう。

かかる化合物としては、例えば、ヘロメチルオキセラン化合物及びビスエポキシ化合物などが挙げられる。ヘロメチルオキセラン化合物としては、エポキシロヒドリン、エポキシプロヒドリン、 β -メチルエポキシロヒドリン及び β -メチルエポキシプロヒドリンなどが挙げられる。ビスエポキシ化合物としては、1,2-ビス(2,3-エポキシプロポキシ)エタン、1,4-ビス(2,3-エポキシプロポキシ)ブタン、1,6-ビス(2,3-エポキシプロポキシ)ヘキサン及びビ

スフェノールA又はスフェノールFのグリシ
グルエーテルなどが挙げられる。

目A又は第II目Aの塩としては、ナトリウム
塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩及びカルセ
ウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属
塩などが挙げられる。

第II目Aは、ヒアルロニダーゼ阻性性を有する
ものであり、次のようにして合成することができ
る。

通常、分子重量千から数万の目A又はその塩
を、0.5%以上、好ましくは1.0%以上の濃度
に、アルカリ水溶液に溶解し、水溶性有機溶剤を
全重量の30%以上、好ましくは50%以上になるよ
うに加える。アルカリ水溶液は、pH 9~14である
ことが好ましく、pH 12~14であることが更に好ま
しい。アルカリとしては、通常、水酸化ナトリウ
ム、水酸化カリウム、水酸化カルシウムなどの金
属水酸化物及び炭酸ナトリウム、炭酸カリウムな
どの金属炭酸塩等が挙げられる。水溶性有機溶剤
としては、メタノール、エタノール、イソプロパ

ノール、アセトン、ジカキサンなどが挙げられ、
これらは、単独で又は混合物として用いられる。
これらの水溶性有機溶剤を加えることにより反応
を有効に行なうことができ、また、アルカリによ
る目Aの分解（低分子化）も抑制することができ
る。

次に、得られた溶液に、前述多官能性エポキ
シ化合物の1当量以上を加え、0~100℃、好まし
くは10~50℃、更に好ましくは20~40℃で反応さ
せる。反応時間は、反応温度により異なるが、
20℃程度では24時間から48時間が好ましく、40℃
程度では2時間から3時間が好ましい。

水反応において、目A又はその塩と多官能性エ
ポキシ化合物とのモル比を変えることにより、得
られる第II目A又はその塩の重合度を調節するこ
とができる。

本発明で用いる第II目Aが目Aの繰り返し二
1000個当り5以上である第II目Aを得るには、
目Aの繰り返し二糖1モルに対し、多官能性エ
ポキシ化合物1モル以上用いればよい。分子重 100

万前後の目Aにおいては、目Aの繰り返し二糖1
モルに対する多官能性エポキシ化合物の使用モル
数を1~10モルにすれば、水溶性で高粘性を有す
る第II目A（以下「B-第II目A」という）を得
ることができ、該使用モル数を10モル以上にすれ
ば、水不溶性でゲル状の第II目A（以下「C-
第II目A」という）を得ることができる。また、
分子重 200万前後の目Aにおいては、それぞれ、
5~8モル、9モル以上で同様の目的を達成でき
る。

B-第II目Aは、高粘性、即ち、目Aに比し
粘度が高く、1%生理食塩水溶液における粘度
（20℃、すり速度1,000rpm）は、通常、500~
50000センチポアーズであり、ポニウムン指数
（延徳仁、北星監学、13、405(1980)）は0.5~
0.9である。

第II目A及びその塩は、ヒアルロニダーゼに対
して阻性性を示すと共に、目Aの有する種々の特
性も維持している。

特に、B-第II目Aは、水溶性であり、また、
高粘性であるにもかかわらず、無害なく注射液を
製造することから、本発明に用いるのに好ましい
ものである。

また、本発明の第II目Aに用いる目Aとし
ては、制限粘度が0.2~30であるもの、即ち、分
子量が40000~2000000であるものが好ましい。

本発明の第II目Aの調製に際しては、前述
制、加糖制、炭化制、炭化制、カプセル制、シロップ
制、懸濁液製しくは凝縮液等の形態にして、又は原
液のまま注射液としてもよいし、注射剤として静
脈内投与、筋肉内投与、門脈内投与、関節腔内投
与、皮下内投与、皮下投与又は関節腔内投与しても
よい。また、坐剤等の形態にして、経腸又は経
口投与してもよい。経口、経腸若しくは経口投
与に適した経腸用の有糖又は無糖の、固形又は液
体の製剤若しくは注射剤を本発明の第II目Aの調
製に用いることができる。水、ゼラチン、乳
糖、でんぷん、ステアリン酸マグネシウム、タル
ク、動物性油脂、ベンジルアルコール、ガム、ポ
リアルキレングリコール、石油樹脂、やし油、ラ

ノリン又は塩基に用いられる他のキャリアー（担体）はすべて、本発明に用いるH Aの担体として適用することができる。また、安定剤、阻害剤、乳化剤等、製造法を変えたり、配合剤の種類をH Aを溶解するための溶媒を補助剤として適用することもできる。

臨床投与量は、H Aの分子量によって異なるが、通常、経口投与により用いる場合には、成人に対しH A又は無水H Aとして、1日20mg〜5g内服するのが好ましく、年齢、病態、症状により適宜増減することが更に好ましい。前記1日量の無水H Aは、1日に1回、又は適宜の間隔を置いて1日に2回しくは3回に分けて投与してもよいし、同次投与してもよい。

また、注射剤として用いる場合には、成人に対しH A又は無水H Aとして、1回量10mg〜2.0gを適量投与又は同次投与することが好ましい。

本発明の無水H Aは、一般の無水H A、例えば、アルキル化剤、代謝阻害剤等にみられる骨髄障害、心毒性、脱毛等の副作用がなく、前記

作用や用量による組織の損傷をすみやかに修復する作用を併有している。更に、本発明の無水H Aは、前記と共に薬剤に投与することができる他の薬質として有効な成分、例えば、一般の抗腫瘍剤又は抗がん剤、抗生物質、止血剤等しくは抗酸化剤、抗感染剤等と併用して相互作用をもたないという長所を有する。

本発明の無水H Aは、その製造からみて、特にプロテオグリカンと無水H Aを混合し、無水H Aに含有している種々の無水H Aの無水H Aに用いられるが、特に、高純度の無水H A、例えば、無水H A（メラノーム）、無水H A（フィブリン）、リン酸（リンフォーム）等に対して優れた効果が期待され、また外科手術時にH Aが最も適当な材料である。このような場合にも、優れた効果が示すと推定される。

以下に、本発明を阻害剤、試薬例及び製造例に基づいて更に詳細に説明するが、これらは、本発明の範囲を何ら制限するものではない。

なお、以下の阻害剤等において、無水H A、クロン酸（グルタロン酸、含有、含有量、含有量の測定並びに抗酸化性、無水H A、無水H A、無水H A、それぞれ、「日経10」一般試験法第20項測定法、2. Biscoe, J. Biol. Chem., 122, 100 (1947), 「日経10」一般試験法第20項測定法、O. E. Leary, et al., J. Biol. Chem., 122, 205 (1947), 「日経10」デキストラン40注射剤、「日経10」一般試験法第20項無水H A試験法、衛生試験法（日本薬学会編）（1980年）1.4 無水H A試験法記載の方法に従って行った。

阻害剤 1. H Aの抽出・精製

無水H Aから抽出した後、直ちに凍結した無水H A 1.0gを加え、0.05%塩化セチルピリジニウム溶液3mlを加え、30℃に3時間保った後、凍結を分解、ミントし、水3mlを加え、プロリレン（上野化学工業株式会社（プロテアーズの商品名）20万単位を加え30℃に3時間保ち、凍結して凍結 34000gを得た。この凍結 34000gに塩化ナトリウム170gを加え、凍結し、次いで88%エタノール 34000gを加え、生じた沈澱を分取・乾燥してH A 0.1gを得た。

更に、このH Aを1%の濃度になるように凍結した生理食塩水に溶解し、一般試験法、例えば、凍結法を行ないH Aの生理食塩水溶液を調製した。

得られたH A溶液及びH A生理食塩水溶液の特性は次の通りであった。

H A溶液（試料 No. H A-1）

無水H A：20.0
クロン酸含有：40.4 分
含有量：0.40 分
含有量：0.01 分
抗酸化性：なし

1%生理食塩水溶液

H A 濃度：1.00%
無水H A：なし
凍結：一般試験 0.01/1
含有 0.01/1

結果から取り出した後、直ちに乾燥した重量10%を溶解し、調製例1に準じてBを調製した。得られたBの粘度及びBの生理食塩水溶液の物性は次の通りであった。

總 體 總 成 : 13.0

● 田舎の割合は：40.7 %

實 際 合 量 : 3.48 %

覆 盖 合 量 : 0.018%

検 査 後 : なし

1. 96生理食鹽水培養

HA 鹽度: 0.00%

同前植物系：なし

價：一般細鋼 0.00/磅

頁数 0部/8

反応した。得られた物質にエタノールを 1.5 重量部を加え沈澱物を得て、再度 2 部の 5A 濃度になるように精製水に溶解し、1.5 重量部のエタノールを加えて沈澱物を得た。沈澱物を 2 部の 5A 濃度になるように精製水に溶解し、沈澱物性皮（121°C で 60 分加熱処理し精製水で洗浄）を加え、沈澱ラジカライト（121°C で 60 分加熱処理し精製水で洗浄）を用いて処理した。処理にエタノールを加えて沈澱物を得た。

得られた目A粉末及び目A生理食塩水溶液の物性は次の通りであった。

目 A 論文 数量 0.78 (資料 No. 附 A-3)

攝 像 速 度 : 7.0

● 田舎合巻 : 49.0 円

電 荷 合 量 : 0.47 電

每 包 合 價：0.01095

姓 名 性別 年齢

REF: 112111

試料 No. Ⅱ A-2 10g を 0.1M 硝酸銀溶液 (200.0) に 1.0 部に溶解し 半量 9 ヒアルロユダーゼ (生化学工業製) 0.5g を加え、50℃ で 1.0 時間

1. 生理食鹽水溶液

問 A 面積 : 1.02%

可燃性物質：なし

價：一般鋼管 0 個/8

寫圖 音標 / 8

例 4. 1A. 2. 3. 4.

試料 No. 11A-2を用いて調製例3に準じて以下の表に示す11Aを製造した。

研究年次	主 要 数 据							1955年合计数	
	研究年度	少子・障害儿数	健常儿数	研究人数	研究割合	研究率	研究率	研究率	研究率
昭和4	2.5	68.20	2.65	0.000	-	1.02	-	0	0
昭和5	0.5	68.40	2.32	0.022	-	1.00	-	0	0
昭和6	0.4	68.70	2.69	0.030	-	1.06	-	0	0

特開昭51-17(5)

例 8. 1. 1. 1. 1.

試料 No. 10-A-2 10gを0.1%の酢酸水溶液 (pH 5.0) に 1% に溶解し、半導体ヒアルロニゲイ 1000g を加えて 50℃ で 37 時間反応した。反応液を減圧下で濃縮し、セフダックス 810 のカラムで濃縮し、更にセフダックス 810 のカラムで 8 倍以上と 8 倍以下とに分画した。8 倍以下の部分を更にセフダックス 810 で濃縮し、減圧下で濃縮後、乾燥装置して乾燥装置した。

得られた 10-A-2 (試料 No. 10-A-7) の物性は次の通りであった。

乾燥 重量: 0.075

クロロホルム: 40.20 部

官能基: 0.40 部

分子量: 0.011 部

性状: なし

乾燥クロマトグラフィー: 1.8 倍以下

(マルチタケザルゲル 807, 乾燥装置 10-プロパノール-アセトニトリル (40:60:2.5), 黄色 アセトニトリル ビド-乾燥)

例 9

(1) 1. 1. 1. 1.

10-A-2 ナトリウム塩 (分子量 7.5×10^3) 10g を 0.1% の酢酸水溶液 (pH 5.0) に溶解し、0.40 μ のミクロフィルタで濾過した。濾液に 10% の酢酸水溶液 (40g) を加えて、減圧下、エタノール 800g とエビタールヒドリン 0.05g を加えた。50℃ で 24 時間反応し、反応液を乾燥装置で pH 5.0 に調整した。エタノール 800g を加えて白色沈降物を得、乾燥後、エタノールで充分に洗浄し、乾燥装置した。

重量: 0.05 (試料 No. 10-A-1)

10-A の乾燥装置 1000 倍以下の乾燥装置

1 例生体食塩水溶液 11000 センチポアーズ (20℃, 予り速度 1.0000%)

非ニュートン指数 0.00

元素分析値 C: 42.0%, H: 4.07%, N: 0.20%, O: 0.01%

(2) 1. 1. 1. 1.

(1) で合成された 10-A-2 と合成に使用した 10-A についてガラスビーズ GPC 8000 (ELECTRO NUCLEONICS, INC. 社) のカラム (8X 850mm) を用いて、乾燥クロマトグラフィーを行なった。乾燥装置は 1.0% の酢酸水溶液を 0.1% の酢酸水溶液で pH 5.0 に調整して使用し、0.32g ずつの濃縮部分に分け、カルパゾール-乾燥装置でクロロホルムを定置した。結果を図 1 に示す。図 1 において、○印及び△印は、それぞれ、10-A-2 及び 10-A の 1 例生体食塩水溶液の予り速度における乾燥装置を調べる。

図 1 から、10-A-2 は、10-A に比し、非常に高分子になっていることがわかる。

(3) 1. 1. 1. 1.

(1) で合成された 10-A-2 と合成に使用した 10-A の 1 例生体食塩水溶液について乾燥装置 (東京計器工業株式会社) を用い、予り速度を変え、57℃ で乾燥装置し、非ニュートン指数

($n = \frac{a}{b}$) を算出した。結果を図 2 に示す。図 2 において、○印及び△印は、それぞれ、10-A-2 及び 10-A の 1 例生体食塩水溶液の予り速度における乾燥装置を調べる。

(4) 1. 1. 1. 1.

(1) で合成された 10-A-2 と合成に使用した 10-A の食塩性を、乾燥装置食塩性測定装置 (池内室, 日本整形外科学会雑誌, 21, 178 (1966)) を用いて作製した装置を用いて測定した。結果を図 3 に示す。図 3 において、○印、△印、及び◇印は、それぞれ、10-A-2 の 0.1% 例生体食塩水溶液、10-A 例生体食塩水溶液及び 10-A の 1 例生体食塩水溶液の予り速度における食塩性を調べる。

図 3 から、10-A-2 は、高い食塩性を有することがわかる。

(5) 1. 1. 1. 1.

(1) で合成された 10-A-2 について、次のようにして、その乾燥装置を検討した。

ビド-乾燥装置の別なく用い、一方の乾燥装置

例 17 (7)

ヒドロキシ基の両端物質として、ブタジエン又はアセチルコリンのそれぞれ 20μs 又は 20μs を 1-ブタジエン 2.0μs/0.5μs 生理食塩水と同時に投与し、投与後の後肢荷重の変動を随時的に測定した。また一例として 1-ブタジエン A の代りに (1) で原料として用いた A ナトリウム塩 50μs/0.5μs 生理食塩水を用いた。前掲の如く、正常時の 50% 荷重回復時間をもって比較した。結果を表 2 に示す。

表 2

投 与 物 質	50% 回復時間
ブタジエン	0.0 分
ブタジエン + A-10μs	0.4 分
ブタジエン + 0-ブタジエン A	0.8 分
アセチルコリン	21 分
アセチルコリン + A-10μs	11 分
アセチルコリン + 0-ブタジエン A	11 分

表 2 から、1-ブタジエン A は、A ナトリウム塩と同様に優れた鎮痛効果を示すことがわかる。

例 17. 1-ブタジエン A の効果

A ナトリウム塩 (分子量 1.7×10^5) の 1% 水溶液に 10% 水酸化ナトリウム 0.10g とメタノール 50g を加えた。溶液中、エビプロムヒドリン 170g を加えて、20℃ で 24 時間反応後、反応液を酢酸で pH 0.5 としてエタノール 100g を加えて白色沈澱を得た。沈澱を採取し、減圧乾燥した。

収 量 000g

A の過剰量と二重
1000 倍当りの濃度 7.01% 生理食塩水溶液 34000 センチグラーズ
における濃度 (20℃, 折光率 1.0000°)

ギムネーティン濃度 0.05

元素分析値 C : 61.00 %, H : 4.70 %, N : 0.30 %, S : 0.40 %

例 18. 鎮痛剤 A の効果

分子量 5.7×10^5 及び 7.0×10^5 の A ナトリウム塩 1000g を、それぞれ、1% 水酸化ナトリウム 0.10g に溶かした溶液に、エタノール 50g とエビプロムヒドリン、それぞれ、25, 50, 100, 200 μs とを加え、40℃ で 2 時間反応した。反応後は

例 18 (1) に準じて後処理を行った。

また、分子量 1.7×10^5 の A ナトリウム塩 750g を 1% 水酸化ナトリウム 7.50g に溶かした溶液にエタノール 7.50g とエビプロムヒドリン 40 μs 又は 80 μs とを加え、40℃ で 2 時間反応した。更に、上記反応と同時に同じ条件で (2) のエビプロムヒドリン (アマヤム・グアベン社から入手) を用いて反応を行ない、この鎮痛化合物の放射能性から鎮痛率を算出した。鎮痛率と濃度との関係を表 3 に示す。

表 3 から、1-ブタジエン A においては、鎮痛率と濃度が比例関係にあることがわかる。

表 3

分子量 (g/mol)	エビプロムヒドリン (μs)	1% 水酸化ナトリウム (g)	エタノール (g)	1% 水酸化ナトリウム (g)	エタノール (g)	1% 水酸化ナトリウム (g)	エタノール (g)
1.7×10^5	0	0	0	0	0	0	0
	25	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
	50	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
	100	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
	200	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
7.0×10^5	0	0	0	0	0	0	0
	25	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
	50	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
	100	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
1.7×10^5	0	0	0	0	0	0	0
	25	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
	50	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
	100	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
	200	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0

* この場合は 0.5% 水酸化ナトリウム

実験例 1. α -ヒドロキシ安息香酸のヒアルロニダーゼ阻害性

分子量 7.2×10^5 の HA ナトリウムを原料として実験例 0 (1) に準じて次に示す 3 種の α -糖糖質 A を合成した。

(A) HA の糖り量し二糖 1000 糖当りの糖糖量	12
1 当生食塩水溶液 における濃度 (20℃, 攪拌速度 1.0×10^4)	45000
ポムートン濃度	0.77
(B) HA の糖り量し二糖 1000 糖当りの糖糖量	11.5
1 当生食塩水溶液 における濃度 (20℃, 攪拌速度 1.0×10^4)	20000
ポムートン濃度	0.70
(C) HA の糖り量し二糖 1000 糖当りの糖糖量	7.5
1 当生食塩水溶液 における濃度 (20℃, 攪拌速度 1.0×10^4)	8000
ポムートン濃度	0.61

ことがわかる。

実験例 2. 阻害作用の濃度範囲に及ぼす影響

FM217p-151 糖糖- 1×10^4 糖/0.2 を含む糖糖溶液 (イーグル 818 糖糖に含有糖糖 10 糖当り) 1.0×10^4 と α -糖糖 A 糖糖 0.15 糖当りを含む糖糖溶液を混合し、糖糖糖糖用シャーレ (ナルヤ社製ペトリイ 137) を 5 糖 0.2 - 0.5 糖 0.1, 37℃ の条件で糖糖した。糖糖糖糖後、3 日目及び 5 日目の糖糖糖糖を測定した。実験は、1 糖 4 シャーレとして、対照群には、生食塩水を糖糖に糖糖したものを用いた。

結果を図 4 に示す。

実験例 1-17 (8)

これらの 3 種の α -糖糖質 A 及び混合に使用した HA ナトリウム糖糖を、それぞれ、0.15 糖糖 (0.2 5.0) に 1 糖の糖糖に糖糖し、糖糖 (20℃, 攪拌速度 1.0×10^4) したところ、次の糖りであった。

α -糖糖質 A (A)	45000 センチポアーズ
α -糖糖質 A (B)	27000 センチポアーズ
α -糖糖質 A (C)	8000 センチポアーズ
HA ナトリウム糖糖	1500 センチポアーズ

これらの糖糖に 0.05 糖糖糖糖になるように半糖糖ヒアルロニダーゼを加え 30℃ で反応させ、15, 35, 55, 75 分後に糖糖を測定し、反応糖糖の糖糖に対する糖糖を算出した。

結果を図 4 に示す。図 4 において、□糖、△糖、○糖及び◇糖は、それぞれ、 α -糖糖質 A (A), (B), (C) 及び HA ナトリウム糖糖の糖糖糖糖の糖糖糖糖時間における反応糖糖の糖糖に対する糖糖を示す。

図 4 から、太光明に用いる α -糖糖質 A は、HA に比し、ヒアルロニダーゼに対する糖糖糖糖が高く、その糖糖は、糖糖糖糖が高いほど糖糖である

糖糖糖糖	HA 糖糖 (g/g/0.2)	糖糖糖糖 (X 10^4 糖/0.2)				糖糖糖糖 (X 10^4 糖/0.2)
		7.5	14	11	12	
対照群	HA-A	100	100	11.4±2.0	12	11.4±2.0
	HA-B	100	100	11.7±2.2	12	11.7±2.2
	HA-C	100	100	8.5±2.5	12	8.5±2.5
	HA-D	100	100	11.2±4.1	12	11.2±4.1
対照群	HA-A	100	100	11.2±1.1	12	11.2±1.1
	HA-B	100	100	11.2±1.1	12	11.2±1.1
	HA-C	100	100	11.2±1.1	12	11.2±1.1
	HA-D	100	100	11.2±1.1	12	11.2±1.1
対照群	HA-A	100	100	11.2±1.1	12	11.2±1.1
	HA-B	100	100	11.2±1.1	12	11.2±1.1
	HA-C	100	100	11.2±1.1	12	11.2±1.1
	HA-D	100	100	11.2±1.1	12	11.2±1.1

度から、HAは細胞の増殖に対して何ら影響を及ぼさないことがわかる。

実験例3. 細胞増殖の促進能に及ぼす影響

10000ファルコン培養皿 (10000 Falcon tissue culture dish) で培養したP815/p-15A細胞をダルベッコリン培養液 (Dulbecco Phosphate Balanced Solution; Ca, Mg-free) (以下「PDS (-)」という) で洗浄し、ヘンクス培養液 (Hanks Balanced Salt Solution; Ca, Mg-free) にトリプシン 0.1% 及びエチレンジアミン四酢酸 0.04% を添加した溶液 (以下「TBS」という) で37℃において5分処理した。同量の培養液【イーグル H29 増進 (Eagle's H29 Essential Medium) に10%になるように牛胎児血清を加えた溶液】を加え、1200rpmで5分遠心し、同培養液で 5×10^5 個細胞/0.5ml に調整した (A島用細胞)。

一方、10000ファルコンペトリ皿 (10000 Petri dish) で培養したP815/p-15A細胞を1200rpmで5分遠心し、前記培養液で 5×10^5 個細胞/0.5ml に調整した (B島用細胞)。

2及び細胞増殖度 0.4 (分子量 1000) のHA-6の方が顕著であることがわかる。

実験例4. 急性毒性試験

(1) マウスにおけるHA-2投与後の組織的死亡数とLD₅₀値を算出する。

HA島用細胞とB島用細胞を10mlずつタイプ1のコラーゲン (以下「CoI」という)、フィブロブラスチン (以下「FN」という) 又はラミニン (以下「LN」という) で被覆した96wellの培養皿に入れ、 1×10^5 細胞/培養皿に調整した。各培養皿に100μlになるように加え、37℃で20時間培養後、PDS (-) で洗浄し、TBSで37℃において15分処理して細胞数を測定した。結果を図5に示す。

図 5

HA 高質	HA-2 細胞増殖度15.0 分子量94万	HA-6 細胞増殖度0.4 分子量1000	HA-7 細胞増殖度0.075 分子量1500	対 照
CoI	100	91	88	84
FN	88	88	85	81
LN	7	2	88	75

度から、本発明の細胞増殖促進剤は、特にLHに対する細胞増殖の促進能を著しく低下させ、その効果は、細胞増殖度 0.075 (分子量 1500) のHA-7に比し、細胞増殖度 15.0 (分子量 94万) のHA-

図 6

LD ₅₀ 値 (mg/kg)	2000		4000		7000		10000	
	1-3	4-6	7-9	10-11	12-14	15-17	18-20	21-23
死亡数	0	0	0	0	0	0	0	0
生存数	12	12	12	12	12	12	12	12
総数	12	12	12	12	12	12	12	12
死亡率 (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
生存率 (%)	100	100	100	100	100	100	100	100

(2) ラサチにおける第A-2投与後の臨時使用
 亡数とLD₅₀値を表7に示す。

特開第61-17(10)

表 7

投与 回数	投与 量 (mg/kg)	観察 日数	死 亡 数 (観察日数)					LD ₅₀ 値 (mg/kg)
			1-3	4-6	7-9	10-14	15-21	
口 投	100	10	0	0	0	0	0	1000
	200	10	0	0	0	0	0	1000
	400	10	0	0	0	0	0	1000
皮下 投	100	10	0	0	0	0	0	1000
	200	10	0	0	0	0	0	1000
	400	10	0	0	0	0	0	1000
腹腔内	750	10	0	0	0	0	0	1000
	1500	10	0	0	0	0	0	1000
	3000	10	0	0	0	0	0	1000

10

年 度	調 査 地 区	調査 人口 (人)	調査 割合	期 間		人口動態 調査年度	人口動態 調査人口 (人)
				1-3 4-6 7-9 10-12	(調査期間)		
昭和 22年度	市 街	2,000	10	0	0	0	2,000
		4,000	10	0	0	0	4,000
		2,000	10	0	0	0	2,000
		4,000	10	0	0	0	4,000

110

を、對照群に比、 β A 又は β 糖質は A の代りに生理食塩水のみを投与した。結果を圖 10 に示す。

実 験 界	測定値		測定回数	時に観察した 樹の根径成長の値	
	根径測定	数 々 量 ($\text{cm}^2/\text{マウス}/\text{day}$)		平均値	対照群に對する百分率
HA-7	0.075	20	20	70.5	85.0
		40	20	74.0	89.2
HA-8	0.4	10	10	25.1	29.0
		20	10	24.0	28.0
HA-5	0.0	10	10	29.0	37.0
		20	10	10.9	24.1
HA-4	2.5	0.01	10	29.9	36.0
		0.10	10	19.0	17.4
		1.00	10	10.4	12.0
HA-3	7.0	0.25	10	10.0	17.0
HA-2	10.0	0.25	20	2.2	2.0
		0.00	10	0.4	11.0
HA-1	20.0	0.25	10	2.0	8.0
2-週間 HA-1	10.0	0.25	10	4.2	8.0
対 照 群			60	80.0	100

特開昭61-17(12)

図 1

又1.0から、本発明の結晶性樹脂は優れた結晶性樹脂であることを示すことができる。

4. 同様の結果を説明

図1は、 β -ジメチルアミンと α -ジメチルアミンのグラフトポリマーを示す図である。図2は、 β -ジメチルアミン及び α -ジメチルアミンの熱安定性を示す図である。図3は、 β -ジメチルアミン及び α -ジメチルアミンの熱安定性を示す図である。図4は、各種 β -ジメチルアミン及び α -ジメチルアミンをセパレート装置を用いたときの熱安定性と時間との関係を示す図である。

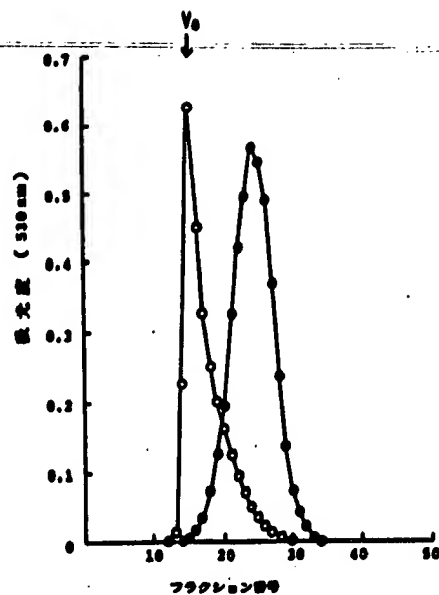


図 2

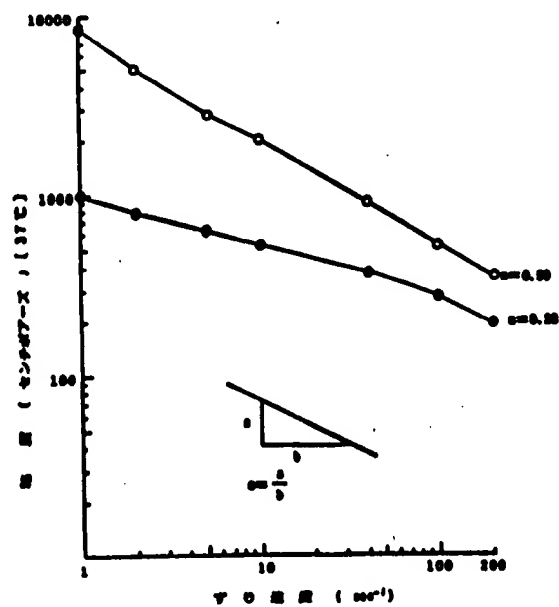
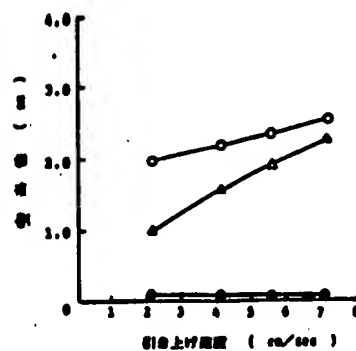


図 3



特許第61-17(18)

図 4

